

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 元 年 5 月 2 3 日現在

機関番号： 3 2 6 5 1

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2016 ~ 2018

課題番号： 1 6 K 1 9 6 7 1

研究課題名 (和文) 体肺側副血行路再現による発生機序の解明と予防的治療選択法の確立

研究課題名 (英文) Assessment of biological characteristics for angiogenesis in aorto-pulmonary collateral artery model rat with left pulmonary artery ligation under hypoxia environment

研究代表者

伊藤 怜司 (ITO, REIJI)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号： 2 0 5 9 5 1 9 4

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,100,000 円

研究成果の概要 (和文) : 外科的に作成した左肺動脈結紮肺血流減少モデルラットは、病理標本および造影CT画像において癒着胸郭より肺内へ迷入する新生血管を認め、体肺側副血行路の再現が可能であった。環境と飼育期間による影響の評価は、側副血管による短絡量を超音波検査による心拍出量算出により行なった。短絡量は低酸素環境で大気環境と比較し早期に増加したが、術後3週以降は差が消失し、肺体血流比1.8~2.0程度で平衡化した。分子生物学的検討では、虚血刺激に伴うHIF-1 等の血管新生因子の増加は低酸素環境により促進されたが、虚血状態が側副血行路により改善されると速やかに消失した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺血流減少型チアノーゼ心疾患では体肺側副血行路を合併し、容量負荷に伴う心不全や正常肺血管床の発育抑制を来す。

本研究により虚血刺激がその発生の中心的役割を持ち、側副血行路による虚血環境の改善により血管新生反応は終息することが明らかになった。本結果を踏まえ肺血流減少型チアノーゼ心疾患に対し、術後早期より酸素吸入等により酸素飽和度を維持し、肺体血流比は1.5程度の肺血流増加状態で管理して遅滞すること無く最終手術に達することが、重篤な体肺側副血行路合併を予防出来ると判断された。

以上によりコイル治療や外科的結紮術が回避できる可能性があり、患者の身体的負担や医療費の削減に繋がる可

研究成果の概要 (英文) : The aortic-pulmonary collateral arteries (APCA) cause heart failure and the developmental suppression of the appropriate pulmonary vasculature through excessive blood flow. APCA rat model with left pulmonary artery ligation reproducibly represented APCA from thoracic cavity to lung under hypoxia than normoxia.

The quantification of APCA was more promoted in hypoxia than normoxia up to 2 weeks after surgery, but after 3 weeks there was no difference in quantifying APCA in both conditions. The ratio of pulmonary and systemic flow increased to 1.8 and has not increased since then. In real time PCR, the increases of angiogenic factors, such as HIF-1 , accompanied by ischemic stimulation was promoted and maintained more in hypoxia, but disappeared rapidly once APCA was grown enough and the ischemic state was improved.

The treatment for the patients with cyanotic congenital heart disease may suppress the growth of APCA through the maintained oxygen concentration and pulmonary blood flow.

研究分野： 小児循環器学

キーワード： 体肺側副血行路 低酸素 血管新生 先天性心疾患 動物モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人工心肺の技術、術後管理の向上に伴い新生児期～乳児期早期に重症の複雑型心奇形の外科的治療が積極的に施行されるようになった。特に単心室に代表されるチアノーゼ型心疾患では、体循環と肺循環を直列回路とするフォンタン手術を最終目標に段階的に治療が行われる。フォンタン症例の治療成績・長期予後を改善するには体循環と肺循環の両方を改善する必要があり、体循環に対して体血管拡張薬や遮断薬が使用され有用性が報告された。一方で肺循環は肺血流量により症状が異なり、増加群では肺高血圧、減少群では体肺側副血行路 (APCA) の増生が問題である。肺高血圧に対しては早期の肺血流制御と肺血管拡張薬が用いられ治療は確立しているが、APCA はコイル塞栓術や外科的結紮術といった侵襲的な治療が行われるが十分とは言えない。APCA は容量負荷に伴う心不全や正常肺血管床の発育抑制、肺動脈リモデリングから晩期合併症を生じる素地となる重大な合併症である。

しかし APCA の発生機序の検討は、発生部位や低酸素血症に伴い血管内皮増殖因子 (VEGF) が上昇し血管新生に関わるとした報告に限られている。フォンタン症例に対して良好な肺循環を維持することは必須であり、APCA に対する詳細な検討が必要である。

血管新生研究は虚血性心疾患や腫瘍・炎症性腸疾患を中心に行われ、低酸素環境が主たるトリガーとなり Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) 等の転写因子が発現し、VEGF を中心とした血管新生促進因子が作用すること、NO を介した血管拡張作用が亢進することが報告された。更に血管新生抑制因子として Vasohibin や Urocortin-2 等が同定され、これら相反する因子が相互作用し秩序的な血管網の形成に関わる事が明らかになった。しかし栄養血管と異なり APCA の様な機能血管に関する詳細な検討は無く、その最大要因は良い実験モデルが確立していないことが挙げられる。

2. 研究の目的

外科的に作成した左肺動脈結紮肺血流減少モデルラットを低酸素環境下で飼育し、体肺側副血行路を再現する。そのモデルラットを用いて体肺側副血行路の発生機序を解明し、血管新生に対して飼育酸素環境および飼育期間が与える影響を評価する。

3. 研究の方法

(1)モデルラットの作成：3週齢の雄 Sprague-Dawley ラット (SD ラット) を用いた。吸入麻酔薬 (isoflurane) を用いて鎮静、18 gauge 留置針外筒を用いて気管内挿管し、人工換気下に左開胸を行う。肺門部の左肺動脈を同定し、周囲組織より剥離した後に結紮を行い閉胸する。全身麻酔の影響を避けるため大気環境下で全身状態の回復を待ち、術後翌日に低酸素室へ入室もしくは大気下で飼育を開始する。低酸素室は密閉性の高い飼育室へ室素ガスを混入し、酸素濃度計により吸入酸素濃度を 10% に維持する。飼育期間は 3 日、1 週、2 週、3 週、4 週とした。

(2)体肺側副血行路の評価：

A. 組織学的検討：作成時と同様に、全身麻酔下に 1xPBS による灌流および 10%ホルマリンにて径気管的に用手膨張し固定を行う。摘出肺は Masson 染色し新生血管を同定する。更に血管新生に関わる因子 (VEGFR1、SMA、Myosin 軽鎖) により免疫染色を行った。

B. 造影 CT：全身麻酔下に開胸し、2 倍希釈硫酸バリウムを右室流出路もしくは左室心尖へ穿刺注入し行った。心肺を一塊にして摘出し、実験小動物用 CT (Lathita) により撮影を行った。

C. 経胸壁心エコー：全身麻酔下に GE 社 Vivid E9 (探触子 12MHz) を用いて、心機能、左肺

動脈血流途絶の確認および各心室流出路を用いて駆出血流量を以下の式を用いて計測した。

なお、右心室駆出量は体静脈還流量を反映し機能的体血流量 (Qs)、左心室駆出量は短絡量を加味した肺静脈還流量を反映し機能的肺血流量 (Qp) として算出した。また個体の体格差を考慮し、短絡量の比較は肺体血流比 (Qp/Qs) で行なった。

式: Cardiac output(ml/min) = the velocity-time integral (VTI)(cm) × pulmonary or aortic annular area(mm³) × heart rate(bpm)

D. 血流量の測定: 経胸壁心エコー検査結果の客観的妥当性評価のために施行した。全身麻酔下に胸骨正中切開を行い、上行大動脈および主肺動脈へ Transonic systems 社の超音波血流計を留置し測定し、得られた結果を心エコー検査と同様に Qp/Qs で比較を行った。

E. 分子生物学的検討: 各タイミングの摘出左肺より SuperScript kit (invitrogen) を用いて抽出した total RNA から cDNA を作成し、血管新生 (HIF-1、VEGF-A、Angiopoietin-1、-2、VEGFR1、VEGFR2、Tie2) および血管収縮 (eNOS、ET-1、RhoA) に関与する遺伝子を、ハウスキーピング遺伝子として β -actin を用いて real time PCR によって遺伝子発現解析を行った。サンプル数は各タイミングで計 8 匹を用いて、得られた結果を対照と比較した。

*注釈: HIF-1: Hypoxia-inducible factor-1、VEGF-A: Vascular endothelial growth factor-A、VEGFR: VEGF receptor、eNOS: endothelial nitric oxide synthase、ET-1: endothelin-1、RhoA: Ras homolog family member A

4. 研究成果

(1)各タイミングにおいて計 10 匹以上の作成を行った。低酸素飼育群では大気飼育群と比較して一日当たりの体重増加は有意に得られず(1.46 ± 1.50 vs 6.97 ± 1.23 , $p < 0.001$)、右心室重量は Fulton's index より有意に増加(0.35 ± 0.07 vs 0.31 ± 0.08 , $p < 0.001$)していた。モデルラットでは左右肺重量比に環境間で

差は認めなかったが、対照と比較して有意に低下($0.40 \pm 0.08/0.41 \pm 0.07$ vs 0.49 ± 0.07 , $p < 0.001$)した。

(図 1; 各データ: 平均値 ± 標準偏差、統計学的解析は Student t test を用いた)

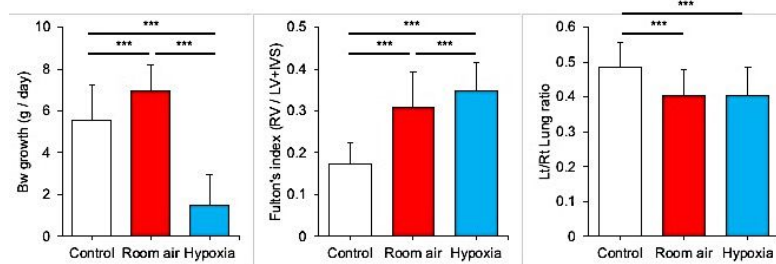


図1. モデル重量変化の比較 (***: $p < 0.001$)

(2)組織学的検討の結果は、左肺では Masson 染色により臓側胸膜の線維性肥厚と同部位に一致して新生血管を認め、肺内へ流入後は気管支を並走し肺門部で収束し、その後は末梢肺動脈へ至る像が得られた。同所見は低酸素飼育群でより強く認められた。免疫染色では新生血管に一致して各抗体が染色されたが、肥厚胸膜より流入する新生血管では他の部位と比較して強く VEGFR1 が染色された。(図 2)

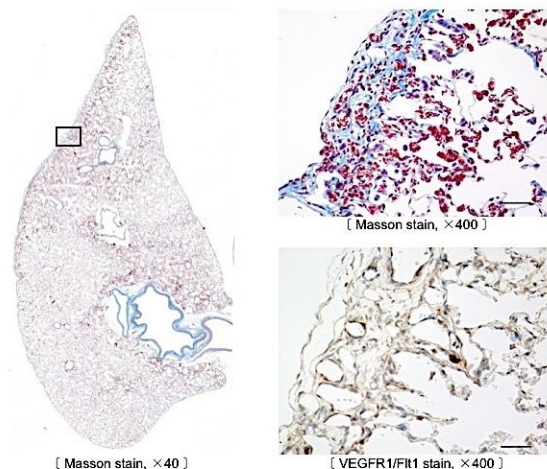


図2. 組織像 (scale bar = 40 μ m)

(3)造影 CT 検査では、右心室造影により左肺動脈離断および左肺の造影欠損像が認められた。また、左心室造影では右肺よりも強い左肺への造影効果を認め、肋間動脈より左肺上葉へ流入する新生血管が認められた。

(図3; RVG: 右心室造影立体構築画像、LVG: 左心室造影水平断面像、BVG: 両心室造影立体構築画像・新生血管を黄色で示す)

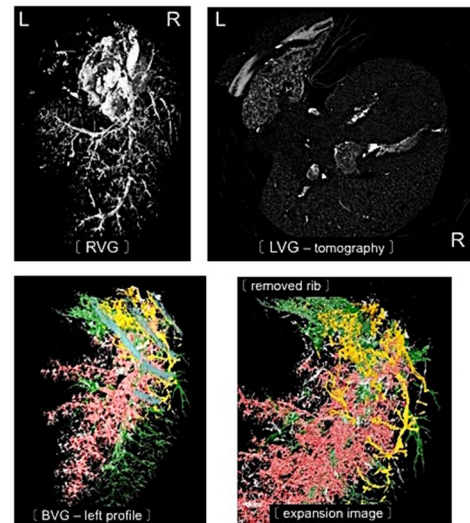


図3. 造影CT画像結果 (黄色 = 新生血管)

(4)経胸壁心エコー検査では、左肺動脈の血流途絶と左肺静脈からの還流血流を確認し、鎖骨下動脈および下行大動脈周囲より肺内へ流入する血流を確認した。計測されたサンプルは対照を含めて全 220 サンプルであった。短絡量の比較のため算出した肺体血流比 (Q_p/Q_s) は、低酸素飼育群では大気飼育群と比較して早期より有意に増加 (one-way ANOVA, $p < 0.05$) したが、術後 3 週以降では差が認められず、以降は平衡化 (2.00 ± 0.13 vs 2.03 ± 0.15) していた。

(図4 上段; データ = 平均値 \pm 標準誤差)

(5)超音波血流計による肺体血流比

(Q_p/Q_s) は、同時に施行された経胸壁心エコーの結果と比較した。同時に行われたのは対照も含め全 22 サンプルあった。両検査間の相関関係は $Y = 0.88X + 0.19$ 、相関係数 $R = 0.76$ 、 $p < 0.001$ であり、経胸壁心エコー検査結果の客観的妥当性が証明された。

(図4 下段; Aorta: 上行大動脈、PA: 主肺動脈)

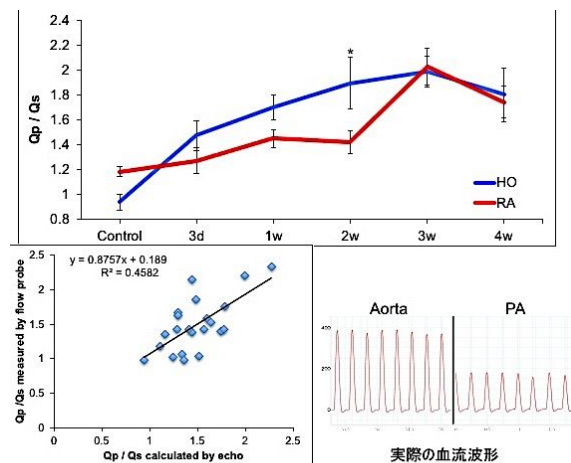


図4. 肺体血流比の経時的変化 (HO: Hypoxia, RA: room air)

(6)分子生物学的検査として施行した real time PCR 検査では、術後 3 日より 2 週までの間に測定された全ての遺伝子が増幅していた。術後 3 週以降はほとんどの遺伝子が基礎値もしくは対照よりも減衰していた。両群共に術後 3 日より

HIF-1 が増幅し、以降 VEGF-A、Angiopoietin-1 および-2、更には各受容体遺伝子が次々と増幅し、この傾向は大気飼育群と比較して低酸素飼育群において遷延していたが、Angiopoietin-2 は両群共に術後 4 週においても増幅していた。また血管収縮に関連する遺伝子は、ET-1 が術後早期に増幅したが、eNOS や ERA 等の血管拡張因子は遷延し発現しており、これらの因子が APCA 発生の中心的役割を担っていると考えられた。

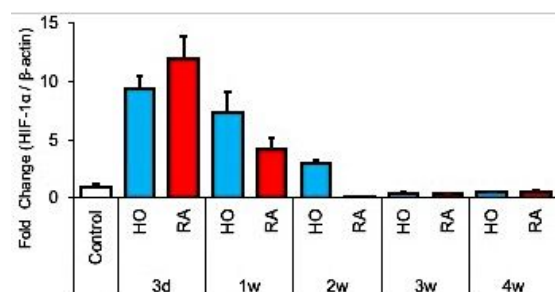


図5. HIF-1α の遺伝子発現

(図 5)

5 . 主な発表論文等

〔 雑誌論文 〕 (計 0 件)

〔 学会発表 〕 (計 8 件)

Reiji Ito, Takashi Urashima, Miki Itohisa, Syunsuke Baba, Yoshitaka Fujimoto, Masatoshi Iijima, Sadataka Kawachi, Masako Fujiwara, Kiyoshi Ogawa, Susumu Minamisawa:
Assessment of biological characteristics for angiogenesis in aorto-pulmonary collateral artery model rat with left pulmonary artery ligation under hypoxia environment, 第 80 回日本循環器学会学術集会, 2016.3

伊藤 怜司, 浦島 崇, 糸久 美紀, 河内 文江, 藤本 義隆, 森 琢磨, 藤原 優子, 小川 潔, 南沢 享:
APCA 発現モデルにおける分子生物学的手法を用いた新生血管発生機序の解明, 第 52 回日本小児循環器学会学術集会, 2016.7

伊藤 怜司, 浦島 崇, 糸久 美紀, 藤本 義隆, 河内 文江, 森 琢磨, 飯島 正紀, 河内 貞貴, 藤原 優子, 小川 潔, 南沢 享, 井田 博幸: APCA 発現モデルにおける分子生物学的手法を用いた新生血管発生機序の解明, 第 133 回成医会総会, 2016.10

伊藤 怜司, 浦島 崇, 糸久 美紀, 河内 文江, 藤本 義隆, 森 琢磨, 飯島 正紀, 藤原 優子, 小川 潔, 南沢 享: APCA 発現モデルラットを用いた新生血管発現量の定量化およびその時間的推移の検討, 日本小児循環器学会学術集会, 2017.7

Reiji Ito, Takashi Urashima, Miki Itohisa, Syunsuke Baba, Yoshitaka Fujimoto, Masatoshi Iijima, Sadataka Kawachi, Masako Fujiwara, Kiyoshi Ogawa, Susumu Minamisawa:
Assessment of biological characteristics for angiogenesis in aorto-pulmonary collateral artery model rat with left pulmonary artery ligation under hypoxia environment, The 13th congress of Asian Society for Pediatric Research, 2017.10

伊藤 怜司, 浦島 崇, 糸久 美紀, 河内 文江, 藤本 義隆, 森 琢磨, 飯島 正紀, 藤原 優子, 小川 潔, 井田 博幸: APCA 発現モデルラットを用いた新生血管発現量の定量化およびその時間的推移の検討, 第 121 回日本小児科学会学術集会, 2018.4

Reiji Ito, Takashi Urashima, Miki Itohisa, Yoshitaka Fujimoto, Masako Fujiwara, Kiyoshi Ogawa, Hiroyuki Ida: Calculation of the shunt flow in aorto-pulmonary collateral artery model rat with left pulmonary artery ligation under hypoxia environment, The 52nd Annual meeting of the association for European paediatric congenital cardiology, 2018.5

伊藤 怜司, 浦島 崇, 糸久 美紀, 河内 文江, 藤本 義隆, 森 琢磨, 飯島 正紀, 藤原 優子, 小川 潔, 南沢 享: APCA 発現モデルラットを用いた新生血管発現量の定量化およびその時間的推移の検討, 第 54 回日本小児循環器学会学術集会, 2018.7

〔 図書 〕 (計 0 件)

〔 産業財産権 〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔 その他 〕

なし

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。